اثرافزودن آنزیم خارج سلولی زایلاناز برتولید گاز و خصوصیات تخمیر شکمبه‌ای کاه برنج در شرایط برون تنی

احمدی بنکدار[۱] ، ی.، وکیلی[۲]، س.ع.، و دانش مسگران[۳]، م.

۱-دانشجو کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی
۲-دانشیار تغذیه دام گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی
۳-استاد تغذیه دام گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی

Vakili_ar@yahoo.com

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی اثر افزودن آنزیم خارج سلولی زایلاناز بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه‌ای کاه برنج در شرایط برون تنی با استفاده از تکنیک تولید گاز انجام شد. چهارسطح آنزیم زایلاناز (۰ ، ۲/۵ ، ۵/۰ و ۷/۵ گرم بر کیلوگرم ماده خشک کاه برنج) به محیط‌های کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه کاه برنج افزوده و به‌مدت ۹۶ ساعت انکوباسیون شد. حجم گاز تولیدی در ساعت های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ اندازه‌گیری شد. پارامترهای تولید گاز تخمین زده شده و همچنین مقدار ناپدید شدن ماده خشک (IVDMD)، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی ($N\text{-}NH_3$) و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) نیز محاسبه گردید. افزودن آنزیم زایلاناز پتانسیل تولید گاز (A) را افزایش و فاز تاخیر (Lag) را کاهش داد. همچنین نرخ جزیی تخمیر (c) و نرخ تولید گاز در ساعت (b)، برای تیمارهای حاوی آنزیم نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. اگرچه میزان ناپدید شدن ماده خشک به‌طور معنی‌داری در تمام سطوح آنزیم بالاتر از تیمار شاهد بود، اما pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی (N-NH3) تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن آنزیم زایلاناز به کاه برنج پارامترهای تخمیری آن را بهبود می بخشد، اگرچه این اثر با افزایش سطح آنزیم مشاهده نمی‌شود.

واژه های کلیدی: کاه برنج ، آنزیم خارج سلولی ، زایلاناز ، تولید گاز

مقدمه

مواد اصلی فیبری قابل هضم هرعلوفه، سلولز و همی‌سلولز می‌باشدکه بوسیله آنزیم‌های فیبرولیتیکی ترشح شده از میکروارگانیسم های شکمبه هضم می‌شوند (۲). اما ساختار مواد فیبری موجود در کاه غلات، به‌گونه‌ای است که سلولز و همی‌سلولز را از دسترس آنزیم‌های موجود در شکمبه دور نگه می‌دارد (۹). استفاده از آنزیم‌های فیبرولیتیک با منشاء خارج سلولی باعث از بین رفتن پیوندهای استری بین لیگنین و پلی ساکاریدهای دیواره سلولی (سلولز و همی‌سلولز) می‌شود و میزان دسترسی آنزیم به ماتریکس دیواره سلولی را افزایش می‌دهد، در نتیجه قابلیت هضم فیبر بهبود می‌یابد (۴). زایلان در بیشتر گونه‌های گیاهی عمده‌ترین جزء همی‌سلولز در دیواره سلولی می‌باشد و بیشتر مطالعات در زمینه اثر آنزیم‌های فیبرولیتیک مربوط به سلولاز و زایلاناز می‌باشد (۱). از طرفی استفاده از آنزیم‌ها همیشه باعث بهبود قابلیت هضم فیبر نمی‌شود زیرا پاسخ حیوان یا شرایط آزمایشگاهی درهنگام مصرف آنزیم یکسان نیست و به‌عوامل مختلفی از قبیل ترکیب جیره، زمان کشت، نوع آنزیم، میزان فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیم و روش کاربرد آن بستگی دارد (۸). هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرآنزیم زایلاناز بر تولید گاز و خصوصیات تخمیری کاه برنج در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش‌ها

ترکیبات شیمیایی کاه برنج پس از نمونه گیری تصادفی، مطابق با روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد. تیمارهای آزمایشی شامل کاه برنج (تیمارشاهد)، کاه برنج به همراه ۲/۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک زایلاناز (تیمار۲)، کاه برنج به همراه ۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک زایلاناز (تیمار۳) و کاه برنج به همراه ۷/۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک زایلاناز (تیمار۴) بودند. آزمون تولید گاز طی دو مرحله صورت گرفت و در ۹ نقطه زمانی قرائت شد. فراسنجه های تولید گاز با استفاده از مدل فرنس (۶)تخمین زده شد.

$$y = A(1 - \exp(-b(t - lag) - c(\sqrt{t} - \sqrt{lag})$$

A پتانسیل تولید گاز ، b نرخ تولید گاز در هر ساعت، c نرخ جزئی تولید گاز و Lag فاز تاخیر می‌باشند. ناپدید شدن ماده خشک (IVDMD) ، PH و غلظت نیتروژن آمونیاکی ($N\text{-}NH_3$) نیز پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون اندازه گیری شد. همچنین میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر نیز با استفاده از روش ماکار۰/۰۰۴۲۵- GP ۰/۰۲۲۲ = SCFA (mmol) محاسبه گردید که GP حجم گاز تولیدی از ۲۰۰ میلی‌گرم نمونهٔ خوراک پس از ۲۴ ساعت می‌باشد.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی کاه برنج مورد استفاده در این مطالعه در جدول۱ و همچنین فراسنجه‌های مربوط به تولید گاز کاه برنج در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی کاه برنج مورد استفاده در آزمایش

ترکیب شیمیایی	درصد ماده خشک
ماده خشک	۹۴/۳۵
پروتئین خام	۶/۰۴
فیبر نامحلول در شوینده خنثی	۷۰/۰۴
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	۵۱/۱
همی سلولز	۱۸/۹۴
خاکستر	۱۲/۰۸

در روند تولید گاز اختلاف معنی‌داری در پتانسیل تولید گاز تیمارها در پاسخ به افزودن آنزیم مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) که بیشترین میزان تولید گاز در سطح آنزیمی ۲/۵ و کمترین سطح آن مربوط به گروه شاهد می باشد، فاز تأخیر با افزودن آنزیم در سطح ۲/۵بیشترین کاهش را نسبت به گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۵$). بنا بر نظر برخی محققین (۱۱) تاثیر آنزیم های افزودنی بر کاه باعث آزاد شدن مقداری کربوهیدرات اضافی شده که این امر سبب افزایش رشد و تجمع باکتری ها بر روی ذرات می شود و همچنین این آنزیم ها با تاثیر بر ذرات غذایی و خارج کردن برخی موانع فیزیکی به تشکیل کلونی میکروبی کمک می کنند (۳) که احتمالا سبب افزایش مقدار گاز تولیدی و کاهش فاز تاخیر (۵) می شود. نرخ جزیی تخمیر در سطح ۲/۵ کمترین مقدار را نشان می دهد در حالیکه گروه شاهد و سطح ۷/۵ تفاوت معنی داری با هم نداشته و دارای بالاترین مقدیر بودند. نتایج نشان داد که افزودن آنزیم زایلاناز به کاه برنج اختلافات معنی داری را در نرخ تولید گاز ایجاد کرده است ($p<۰/۰۵$) به طوریکه گروه شاهد دارای بیشترین مقدار و گروه آنزیمی ۲/۵ کمترین مقدار نرخ تولید گاز را داشتند. همچنین در این آزمایش ناپدید شدن ماده خشک افزایش یافت (جدول ۳) که این نتایج با نتایج وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ هماهنگی دارد(۱۲). میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر نیز در تیمار۲ نسبت به تیمارهای دیگر به طور معنی داری بالاتر بود. نتایج نرسکو و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۷) نشان داد که مقادیر کم آنزیم ها باعث ایجاد تغییر مناسب در ساختمان دیواره سلولی مواد می شوند اما مقادیر زیاد با اتصال به ذرات غذا میزان اتصال میکروبی را کاهش می

دهند یا اتصالات ناقصی را برقرار می کنند ، به علاوه مقدار زیاد آنزیم باعث آزاد شدن عوامل ضد تغذیه ای نظیر ترکیبات فنولیک (۱۰) شده که میزان هضم میکروبی مواد غذایی را تحت تاثیر قرار می گیرد.

جدول۲- فراسنجه های تولید گاز و متوسط نرخ تخمیر کاه برنج به همراه مقادیر مختلف آنزیم زایلاناز(گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

فراسنجه	تیمارهای آزمایشی				SEM	P value
	کاه برنج بدون آنزیم	کاه برنج 2/5 واحد آنزیم	کاه برنج با ۵ واحد آنزیم	کاه برنج با ۷/۵واحد آنزیم		
A	۲۹/۹۳۴^{c}	۳۹/۳۲۵^{a}	۳۱/۹۳۸^{b}	۳۱/۱۵۹^{b}	۰/۹۵۱۲	۰/۰۰۰۲
b	۰/۰۴۳۱^{a}	۰/۰۳۵۲^{d}	۰/۰۳۹۰^{c}	۰/۰۴۰۸^{b}	۰/۰۰۱۲	۰/۰۱۵۵
c	۰/۱۵۶۷^{a}	۰/۱۰۶۶^{c}	۰/۱۳۱۴^{c}	۰/۱۵۱۱^{a}	۰/۰۰۹۲	۰/۰۲۱۸
Lag	۳/۲۸۵۴^{a}	۲/۲۹۸۰^{c}	۲/۸۲۸۳^{b}	۳/۴۳۰۸^{a}	۰/۲۳۷۴	۰/۰۴۵۲

A، پتانسیل تولید گاز (میلی متر در ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)؛ b، نرخ ولید گاز در هر ساعت؛ c نرخ جزئی تخمیر در هر نیم ساعت؛ Lag، فاز تأخیر(ساعت)

جدول۳- فراسنجه‌های تخمیری در روش تولید گاز و کشت تخمیری بسته با مقادیر مختلف آنزیم زایلاناز (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

فراسنجه	تیمارهای آزمایشی				SEM	P Value
	کاه برنج بدون آنزیم	کاه برنج با ۲/۵ واحدآنزیم	کاه برنج با ۵ واحد آنزیم	کاه برنج با ۷/۵ واحد آنزیم		
IVDMD	۴۴/۱۵۰^{d}	۵۵/۵۰۰^{a}	۴۸/۵۰۰^{c}	۵۰/۵۰۰^{b}	۱/۵۷۷۱۸	۰/۰۰۳
SCFA	۰/۲۴۹۰۷^{c}	۰/۳۳۴۶۱^{a}	۰/۲۶۰۵۴^{b}	۰/۲۴۲۸۸^{c}	۰/۰۱۲۳	۰/۰۰۰۱
pH	۶/۹۴	۶/۹۵	۶/۹۰	۶/۹۲	۰/۰۱۳۹	۰/۴۲۷۷
N-NH3					۰/۰۸۲۵	۰/۱۸۷۹

IVDMD ، ناپدید شدن ماده خشک در شرایط برون تنی؛SCFA،اسید های چرب کوتاه زنجیر(میلی مول بر لیتر)؛
N-NH3، ازت آمونیاکی بر حسب میلی گرم بر لیتر(۲۴ ساعت)؛ pH،۲۴ ساعت

فهرست منابع

1. Ariolla, K. G., Kim, S. C., Staples, C. R., and Adesogan, A. T. 2011. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94 :832–841
2. Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., and Yang, W. Z. 2002. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Anim Sci*. 81:E37-E47.
3. Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, W. Z. Yang, and L. M. Rode. 2004.Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. Can. *J. Anim. Sci.*, 84:13-22.
4. Dean, D. B., Adesogan, A. T., Krueger, N. and Littell, R. C. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. *J. Dairy Sci.* 88:994–1003.
5. Forsberg, C. Forano, E, and A. Chesson . 2000. Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. In : Ruminant physiology, digestion, metabolism, growth and reproduction. P.B. Cronje (ED), pp. 79-97. CABI Publishing. Wallingford, UK.
6. France, J., J.Dijkstra, M. S. Dhanoa, S. Lopez, and A. Bannink. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of

models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr*. 83:143-150.
7. Nsereko, V. L., K. A. Beauchemin, D. P. Morgavi, L. M. Rode, A. F. Furtado, T. A. McAllister, A. D. Iwaasa, W. Z. Yang, and Y.Wang .2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from Trichoderma longibrachiatum on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J. Microbial*., 48:14-20.
8. Ranilla, M. j., Tejido, M. L., Giraldo, L. A. and Tricárico, J. M. 2008. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on in vitro ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *J. Anim. Feed Sci. Technol*. 145:109-121.
9. Tan, Z. L., Chen, H. P., He, L. H., Fang, R. J. and Xing, T. X. 1995. Variation in the nutritional characteristics of wheat straw. *J. Anim. Feed Sci. Technol*. 53:337–344.
10. Treacher, R. J., and C. W. Hunt.1996. Recent developments in feed enzymes for ruminants. Proc. Pac. Northwest Anim. Nutr. Conf. Seattle, WA. Pacific Northwest Anim. Nutr. Conf., Portland, OR.
11. Wang, Y ., T. A. McAllister. 2002a. Investigation of exogenous fibrolytic enzyme activity on barley straw using in vitro incubation. *J. Anim. Sci.*, 80(suppl. 1),316.
12. Wang, Y. Spartling, B. M., Zobell, D. R., Wiedmeier, R.D., and T. A. McAllister. 2004. Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenouse fibrolytic enzymes. *J. Anim. Sci.*, 82:198-208.

The effects of extracellular xylanase on in vitro gas production and ruminal fermentation characteristics of rice straw

Ahmadi bonakdar[1],Y., Vakili[2] ,S.A., and Danesh Mesgaran[3] ,M.

1- MSc student of Ferdowsi University of Mashhad, Department of Animal Sciences

2-Professor of Ferdowsi University of Mashhad, Department of Animal Sciences

3-Professor of Ferdowsi University of Mashhad, Department of Animal Scienc

Abstract

This study was carried out to investigate the effects of extracellular xylanase on ruminal fermentation characteristics of rice straw by in vitro gas production technique. Four levels of xylanase (0, 2.5, 5 and 7.5 g/kg dry matter) in a medium containing 200 mg rice straw were added and incubated for 96 h. the gas volume was recorded 2, 4, 8, 12, 16, 24, 48, 72 and 96 h after incubation and gas production parameters were estimated. In vitro dry matter disappearance (IVDMD), pH and the concentrations of N-NH3 and short chain fatty acids were also measured. The addition of xylanase increased gas production potential (a) and decrease lag time (Lag). Higher levels of gas production rate (b) and fractional fermentation rate (c) were observed for enzyme treatments in comparison with control. Although IVDMD for enzyme treatments was significantly higher than control, but no effects of xylanase were observed for pH and N-NH3 concentration. The results indicated that xylanase supplementation of rice straw improved in vitro gas production parameters, however, Intangible effects were observed at higher levels of the enzyme.

Key words: rice straw, extracellular enzyme, xylanase, gas production